

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19)世界知的所有権機関  
国際事務局



(43)国際公開日  
2005年8月18日 (18.08.2005)

PCT

(10)国際公開番号  
WO 2005/075680 A1

(51)国際特許分類<sup>7</sup>: C12Q 1/68, C12N 15/10, G01N 33/50

(21)国際出願番号: PCT/JP2005/001840

(22)国際出願日: 2005年2月8日 (08.02.2005)

(25)国際出願の言語: 日本語

(26)国際公開の言語: 日本語

(30)優先権データ:  
特願2004-032617 2004年2月9日 (09.02.2004) JP

(71)出願人(米国を除く全ての指定国について): 扶桑  
薬品工業株式会社 (FUSO PHARMACEUTICAL IN-  
DUSTRIES, LTD.) [JP/JP]; 〒5410045 大阪府大阪市中  
央区道修町1丁目7番10号 Osaka (JP).

(72)発明者; および

(75)発明者/出願人(米国についてのみ): 松久 明生 (MAT-  
SUHISA, Akio). 山本 誠司 (YAMAMOTO, Seiji). 江田  
宗司 (EDA, Souji). 山崎 伸二 (YAMAZAKI, Shinji).

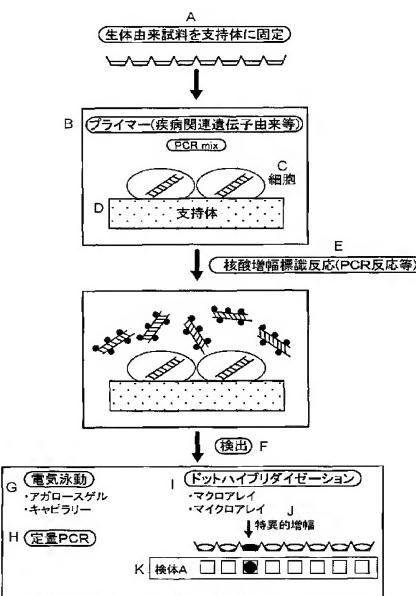
(74)代理人: 特許業務法人原謙三国際特許事務所  
(HARAKENZO WORLD PATENT & TRADE-  
MARK); 〒5300041 大阪府大阪市北区天神橋2丁目  
北2番6号 大和南森町ビル Osaka (JP).

(81)指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が  
可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR,  
BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,  
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,  
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,  
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA,  
NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE,

/ 続葉有 /

(54) Title: METHOD OF DETECTING NUCLEIC ACID AND UTILIZATION THEREOF

(54)発明の名称: 核酸検出方法およびその利用



- A FIXATION OF BIOLOGICAL SAMPLE ON SUPPORT
- B PRIMER (ORIGINATING IN DISEASE-ASSOCIATED GENE OR THE LIKE)
- C CELL
- D SUPPORT
- E NUCLEIC ACID AMPLIFICATION/LABELING REACTION (PCR OR THE LIKE)
- F DETECTION
- G ELECTROPHORESIS  
·AGAROSE GEL  
·CAPILLARY
- H QUANTITATIVE PCR
- I DOT HYBRIDIZATION  
MACROARRAY  
MICROARRAY
- J SPECIFIC AMPLIFICATION
- K SAMPLE A

**(57) Abstract:** It is intended to provide a method of detecting a nucleic acid whereby a target nucleic acid can be accurately and quickly detected at an elevated detection sensitivity compared with the existing methods; and a gene detection kit with the use of this method. A sample containing cells is fixed to a support and nucleic acids are amplified on the support as such. Then a nucleic acid thus amplified is detected. Since the nucleic acids are not extracted from the sample in this method, a lowering in the detection sensitivity due to the nucleic acid loss in the step of extracting the nucleic acids can be prevented. Since the amplified nucleic acid is detected, furthermore, detection can be made even though the nucleic acid is contained only in a trace amount in the sample.

**(57) 要約:** 従来の方法より検出感度を高めるとともに、正確かつ迅速に標的核酸を検出することが可能な核酸検出方法および当該方法を用いる遺伝子検出キットを提供する。細胞を含む試料を支持体に固定し、そのまま支持体上で核酸を増幅し、増幅された核酸を検出する。試料から核酸を抽出しないので核酸抽出過程の核酸のロスに伴う検出感度の低下を防止できる。また、増幅後の核酸を検出するので、試料に含まれる標的核酸が微量であっても検出可能となる。

WO 2005/075680 A1



SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 國際調査報告書
- 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき國際事務局から入手可能

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

## 明 細 書

### 核酸検出方法およびその利用

#### 技術分野

[0001] 本発明は、核酸検出方法およびその利用に関するものであり、より具体的には、試料中の微量核酸を効率よく増幅し、正確かつ迅速に検出する方法、および当該方法を利用した遺伝子検出キットに関するものである。

#### 背景技術

[0002] ある特定の核酸や遺伝子の存在の有無を調べたい場合、標的の核酸や遺伝子を増幅し、その増幅産物を検出する方法が用いられる。標的の核酸や遺伝子を特異的に増幅させる方法としては、PCR法(例えば、非特許文献1、2参照)、RT-PCR法(例えば、非特許文献1、2参照)、ICAN法(例えば、特許文献1参照)、LAMP法(例えば、非特許文献3参照)、RCA法(例えば、非特許文献4参照)、プライマーエクステンション法(例えば、非特許文献5参照)等が知られている。なかでもPCR法、RT-PCR法が最もよく使われている。これらの方法は、目的とする核酸の塩基配列を含む短い核酸をプライマーとして用いて、DNAポリメラーゼまたはRNAポリメラーゼによる鑄型特異的な核酸合成反応をin vitroで行う方法である。

[0003] さらに、上記核酸増幅方法において、増幅反応中または増幅反応後に、増幅された核酸断片を適当な手段を用いて標識することにより、試料中にわずかしか存在しない核酸を検出することが可能となる。また、ランダムな塩基配列のプライマーを使用し非特異的に核酸を増幅および標識し、それを用いて核酸を検出するDNAマイクロアレイ(マクロアレイ)法やディファレンシャルディスプレイ法等も知られている。近年、様々な疾病に関連する遺伝子を網羅的に検出するDNAマイクロアレイは、非常に注目を集めている。

[0004] また、ある特定の核酸や遺伝子を調べたい場合、上記核酸増幅方法以外の方法として、組織や細胞中の標的となる核酸を、それと相補的な塩基配列を含む標識した核酸をプローブとしてハイブリダイゼーションさせるISH法(in situ ハイブリダイゼーション法)やFISH法(fluorescein in situ ハイブリダイゼーション法)がある(例えば、非

特許文献1参照)。ISH法は組織内の特定の遺伝子の発現の有無や量の比較に広く用いられている。FISH法は染色体上の特定の遺伝子領域の判別に広く用いられている。

- [0005] また、PCR法で標的核酸を増幅し、ISH法によりプローブを用いてハイブリダイゼーションさせ、最終的に顕微鏡で検出するin situ PCR法(例えば、非特許文献2参照)も存在するが、反応に最適な条件を出すのが困難であるため再現性に乏しく、一般化していない。
- [0006] 本出願人は、ISH法に基づいて末梢血における白血球中の細菌検出キット「ハイブリゼップ(登録商標)」を体外診断用医薬品(承認番号:AMZ00620000)として販売している。「ハイブリゼップ(登録商標)」を用いた場合、従来用いられている血液培養法と比較して約4倍の感度で菌を検出することが可能となり、少なくとも3日以上を要した検査時間を1日以内で行うことが可能となったことから、感染症分野において脚光を浴びている(例えば、非特許文献6参照)。なお、本出願人は、食細胞に貪食された外来微生物をISH法に基づいて検出および同定のための方法(特許文献2参照)およびその改良方法(特許文献3参照)を提案しており、「ハイブリゼップ(登録商標)」はこれらの発明に基づいて開発された商品である。
- [0007] [特許文献1]特許第3433929号公報(登録日:平成15年5月30日、発行日:平成15年8月4日)  
[特許文献2]国際公開WO89/10411(国際公開日:1989年11月2日、対応公告公報:特公平07-40号)  
[特許文献3]国際公開WO02/099133(国際公開日:2002年12月12日)  
[非特許文献1]J. Sambrook et al. 「Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Third Edition」 Cold Spring Harbor Laboratory (2001)  
[非特許文献2]監修:真木寿治、「PCR Tips—使いこなすためのコツとヒントー」秀潤社(1999)  
[非特許文献3]Tsugunori Notomi et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic Acids Research, vol.28, No.12: e63 (2000)  
[非特許文献4]Lizardi PM et al. Mutation detection and single-molecule counting

using isothermal rolling-circle amplification. *Nature Genetics*, jul;19(3):225-32. (1998)

[非特許文献5] B.D.Hames, S.J.Higgins:著、堀越正美:訳「遺伝子発現と転写因子」メディカル・サイエンス・インターナショナル(1996)

[非特許文献6] 松久明生、荒木宏昌、「In Situ Hybridization法による敗血症診断の臨床的有用性」、BIO Clinica、北隆館、1999年、14巻、1号、p. 97-101

ここで、ある特定の核酸や遺伝子の存在の有無を調べたい場合に用いる、上記PCR法等の核酸増幅方法や、ISH法等のハイブリダイゼーションを用いる方法では、標的とする核酸や遺伝子が試料中に微量しか存在しない場合に、十分な検出感度、再現性、簡便性等を実現できない場合があるという課題を有している。

[0008] まず、PCR法等の核酸増幅方法を用いる方法では、試料から核酸を抽出する必要がある。この核酸を抽出する過程で、核酸のロスが生じることを回避することは困難である。例えば、試料中に増幅するための錫型として必要な量の標的核酸が含まれていたとしても、核酸抽出過程のロスにより錫型として必要な量が回収できなかった場合には、増幅効率が低下するため標的核酸を十分増幅できず、試料中の標的核酸を検出できない場合が生じ得る。このような場合は、偽陰性となり、正確な結果が得られない。また、同一の試料を用いた場合でも、核酸抽出過程のロスの程度により異なった結果が得られる可能性があり、再現性が乏しくなる。すなわち、核酸の抽出を必要とする核酸増幅方法においては、試料中に含まれる標的の核酸が非常に微量である場合に、核酸抽出過程の核酸のロスにより、増幅効率の低下に起因する検出感度の低下を招くという問題がある。

[0009] また、増幅反応を阻害する物質(例えば、ヘパリン、界面活性剤、タンパク質変性剤、有機溶媒等)が試料溶液中に含まれている場合があり、上記と同様に、増幅効率の低下に起因する検出感度の低下を招くという問題もある。

[0010] 次に、ISH法等のハイブリダイゼーションを用いる方法では、試料から核酸を抽出する必要がないため核酸のロスは生じないが、試料に含まれる標的の核酸が非常に微量である場合には、標的核酸とハイブリッドを形成しているプローブ核酸を検出するのが困難であるという問題がある。

[0011] また、本出願人が開発した「ハイブリゼップ(登録商標)」は、ISH法に基づいて末梢血における白血球中の細菌を高感度かつ迅速に検出することを可能としたが、克服すべき課題として以下の2点を挙げることができる。

- 1) 菌のシグナルの有無は顕微鏡による肉眼的観察に委ねられているため、ある程度の熟練を要すること。
- 2) 白血球に貪食された細菌のみが検出標的であるため、白血球数の減少した患者の臨床検体については、検出率が低下すること。

[0012] 本発明は、上記の問題点に鑑みてなされたものであり、その目的は、試料中に含まれる標的核酸が非常に微量であっても、正確かつ迅速に標的核酸を検出することができる核酸検出方法を提供することにある。

## 発明の開示

[0013] 本発明者らは、上記の課題を解決するために鋭意検討した結果、試料を支持体に固定し、試料から核酸を抽出せずにそのまま支持体上で核酸を増幅することにより、試料中の核酸のロスに伴う検出感度の低下を招くことなく、簡便かつ迅速に試料中の標的核酸の検出が可能であることを見出し、本発明を完成させるに至った。すなわち本発明は、以下の発明を包含する。

[0014] (1) 細胞を含む試料を支持体に固定する試料固定化工程と、試料中の核酸を支持体上で増幅する核酸増幅工程と、増幅された核酸が標的の核酸であるか否かを判定する判定工程とを含むことを特徴とする核酸検出方法。

[0015] (2) 上記核酸増幅工程の前段に、試料に含まれる核酸を露出させる核酸露出工程を含むことを特徴とする、(1)に記載の核酸検出方法。

[0016] (3) 上記核酸露出工程における核酸露出方法として、界面活性剤処理法、酵素処理法または加熱処理法のいずれか1の方法、あるいは2以上の方法を組み合わせて用いることを特徴とする(2)に記載の核酸検出方法。

[0017] (4) 上記核酸増幅工程における核酸増幅方法として、PCR(ポリメラーゼ連鎖反応)法を用いることを特徴とする(1)ないし(3)のいずれか1項に記載の核酸検出方法。

[0018] (5) 上記核酸増幅工程において増幅された核酸を標識することを特徴とする(1)ないし(4)のいずれか1項に記載の核酸検出方法。

- [0019] (6) 上記判定工程における判定方法として、核酸増幅工程で増幅かつ標識された核酸をプローブとし、当該プローブと既知の遺伝子断片との相補的なハイブリダイゼーションを指標として標的の核酸であるか否かを判定することを特徴とする(5)に記載の核酸検出方法。
- [0020] (7) 上記既知の遺伝子断片は、あらかじめ支持体に固定されていることを特徴とする(6)に記載の核酸検出方法。
- [0021] (8) 上記判定工程における判定方法として、核酸増幅工程で増幅かつ標識された核酸をプローブとし、DNAマイクロアレイを用いて標的の核酸であるか否かを判定することを特徴とする(5)に記載の核酸検出方法。
- [0022] (9) 上記試料は生体由来試料であることを特徴とする(1)ないし(8)のいずれか1項に記載の核酸検出方法。
- [0023] (10) 上記生体由来試料はヒト由来であることを特徴とする(9)に記載の核酸検出方法。
- [0024] (11) (1)ないし(10)のいずれか1項に記載の核酸検出方法を実施するためのキットであって、試料中の標的遺伝子を検出するために使用する遺伝子検出キット。
- [0025] (12) (10)に記載の核酸検出方法を実施するためのキットであって、ヒトの疾患関連遺伝子を検出するために使用する遺伝子検出キット。
- [0026] (13) 上記ヒトの疾患関連遺伝子はヒトに感染した感染症原因微生物の遺伝子である(12)に記載の遺伝子検出キット。
- [0027] (14) 上記ヒトに感染した感染症原因微生物の遺伝子は薬剤耐性遺伝子である(13)に記載の遺伝子検出キット。
- [0028] (15) 上記ヒトに感染した感染症原因微生物の遺伝子は薬剤感受性遺伝子である(13)に記載の遺伝子検出キット。
- [0029] (16) 上記ヒトの疾患関連遺伝子は癌マーカー遺伝子である(12)に記載の遺伝子検出キット。
- [0030] (17) 上記ヒトの疾患関連遺伝子は遺伝性疾患関連遺伝子である(12)に記載の遺伝子検出キット。
- [0031] (18) 少なくとも、標的遺伝子増幅プライマー、PCR反応用緩衝液、デオキシヌクレ

オシド三リン酸混合液、標識デオキシヌクレオシド三リン酸、耐熱性DNA合成酵素、試料固定化用支持体、増幅核酸検出用指示薬を含むことを特徴とする(11)ないし(17)のいずれか1項に記載の遺伝子検出キット。

- [0032] 上記の構成によれば、試料中に含まれる標的核酸が非常に微量であっても核酸の抽出に起因する核酸のロスがほとんど生じず、高感度、高精度で再現性よく標的核酸を検出することが可能となる。また、簡便かつ迅速に実施でき、結果の判定に熟練を要しない。
- [0033] 本発明のさらに他の目的、特徴、および優れた点は、以下に示す記載によって十分わかるであろう。また、本発明の利益は、添付図面を参照した次の説明で明白になるだろう。

#### 図面の簡単な説明

- [0034] [図1]本発明に係る核酸検出方法の一例を示した図である。
- [図2]試料に貪食サンプルを用いて、本発明の核酸検出方法により白血球に貪食された微生物を検出した結果を示す電気泳動画像である。
- [図3]試料に敗血症患者の臨床検体を用いて、本発明の核酸検出方法により白血球に貪食された微生物を検出した結果を示す電気泳動画像である。
- [図4]試料に敗血症血液モデルを用いて、本発明の核酸検出方法により白血球におけるIL6の発現増加を検出した結果を示す電気泳動画像である。

#### 発明を実施するための最良の形態

- [0035] 本発明の実施の一形態について説明すれば、以下の通りである。なお、本発明は、これに限定されるものではない。
- [0036] 1. 本発明に係る核酸検出方法

本発明に係る核酸検出方法は、細胞を含む試料を支持体に固定する試料固定化工程と、試料中の核酸を支持体上で増幅する核酸増幅工程と、増幅された核酸が標的の核酸であるか否かを判定する判定工程とを含むことを特徴としており、さらに、核酸増幅工程の前段に、試料に含まれる核酸を露出させる核酸露出工程が含まれていてもよい。図1に、本発明に係る核酸検出方法の1つの実施形態を示した。図1に示した実施形態では、生体由来試料を支持体に固定(試料固定化工程)し、疾病関

連遺伝子由来のプライマーを含むPCRミクスチャーを加えてPCRを行う(核酸増幅工程)。この核酸増幅工程において核酸増幅と同時に、または核酸増幅後に増幅された核酸を標識する(詳細は後述する。)。そして最後に、電気泳動(アガロースゲル電気泳動、キャピラリー電気泳動等)、定量PCR、ドットハイブリダイゼーション(マクロアレイ、マイクロアレイ等)等の核酸検出手段を用いて、増幅された核酸が標的の核酸であるか否かを判定する(判定工程)。なお、本発明に係る核酸検出方法は、図1に示した実施形態に限定されるものではない。以下に本核酸検出方法について、その特徴を詳細に説明する。

[0037] (1)試料固定化工程

試料固定化工程は、試料を支持体に固定化する工程である。試料を支持体に固定化することにより、核酸増幅や標識の際に一般的に行なわれる核酸精製工程を省くことができる。また、試料溶液に核酸の増幅反応を阻害する物質(例えば、ヘパリン、EDTA-2Na、陽イオン、高蛋白溶液、高塩濃度溶液、界面活性剤含有溶液、タンパク変性溶液(尿素、グアニジン塩酸等)、有機溶媒等)が含まれている場合に、これらの増幅阻害物質は通常細胞内に滞留することがないため、試料を支持体に固定化することにより容易に除去することができる。さらに、試料を支持体に固定化することにより、核酸を安定に保存することも可能となる。

[0038] [試料]

本発明に係る核酸検出方法(以下、適宜「本検出方法」と略記する。)に用いる試料は、細胞を含む試料であればよい。本検出方法により検出する標的核酸は、DNA(デオキシリボ核酸)およびRNA(リボ核酸)のいずれでもよい。細胞にはこれらの核酸(DNAおよびRNA)が含まれているため、その中の標的核酸を本検出方法で検出することが可能となる。細胞の種類は限定されるものではなく、動物細胞、植物細胞、微生物細胞等のあらゆる細胞を対象とすることができる。また、試料の細胞以外の部分は、後述する核酸露出工程において化学処理、酵素処理、加熱処理等により消化可能であって、含まれる細胞の核酸が露出できるものであればよい。本検出方法に用いる試料としては、細胞を含む生体由来試料が好適であるが、これに限定されるものではなく、生体に由来しない試料にも本検出方法を適用することは可能である。

- [0039] 生体に由来しない試料としては、例えば、細胞を含む食品材料、土、水、繊維、埃等を挙げることができる。生体由来試料としては、動物および植物の生体構成成分を好適に用いることができる。ヒトを含む動物由来の試料としては、例えば血液、組織液、リンパ液、脳脊髄液、膿、粘液、鼻水、喀痰、尿、糞便、腹水等の体液類、皮膚、肺、腎、粘膜、各種臓器、骨等の組織、鼻腔、気管支、皮膚、各種臓器、骨等を洗浄した後の洗浄液を挙げができる。さらにヒトの場合は透析排液も試料とすることが可能である。
- [0040] また、本検出方法の標的とする核酸は試料に含まれる細胞固有の核酸に限定されず、細胞に感染したウイルスの核酸や、細胞が貪食した微生物等の核酸にも適用することが可能である。したがって、感染症患者の貪食細胞(白血球等)を含む生体由来試料は、本検出方法の試料として好適である。
- [0041] [支持体]
- 支持体は、その表面に試料を固定化するとともに、当該支持体上で試料中の標的核酸を増幅するために用いるものである。したがって、このような目的を達成できる支持体であれば、材質、形状等は特に限定されるものではない。材質としては、例えば、ガラス、金属、合成樹脂(ポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリ塩化ビニル、ポリエステル、ポリアクリル酸エステル、ナイロン、ポリアセタール、フッ素樹脂等)、多糖類(セルロース、アガロース等)、濾紙等を挙げができる。また、形状としては、例えば、板状、盆状、球状、繊維状、棒状、盤状、容器状、セル、管状等の種々の形状とすることができます、本検出方法を実施する条件に合わせて適宜好ましい形状のものを選択すればよい。
- [0042] 一つの支持体に対して1試料を固定化し、試料数に応じた数の支持体を用いてもよいが、作業を効率的に行うためには一つの支持体に複数の試料を固定化できることが好ましい。また、本検出方法では、試料固定化工程→核酸増幅工程、または試料固定化工程→核酸露出工程→核酸増幅工程を同一支持体上で一連の操作として行うため、一つの支持体に複数の試料を固定化した場合に、隣接する試料が混じり合わないようにする必要がある。したがって、本検出方法に用いる支持体としては一つの支持体上に複数の分離した区画を有するものが好ましい。さらに、本検出方

法の核酸増幅工程において、PCR法を用いて核酸を増幅する場合には、耐熱性素材であることが好ましい。さらに、市販されているPCR用遺伝子増幅機器(サーマルサイクラー)に適合する形状であることが特に好ましい。

[0043] [固定]

本発明に係る核酸検出方法において、固定とは、試料を何らかの方法により支持体に固着、保持させることを意味する。本検出方法に用いる固定方法は特に限定されるものではなく、従来公知の固定方法を適宜選択して用いればよい。公知の固定方法としては、共有結合やイオン結合などで不溶性の担体に結合させる担体結合法、架橋試薬により共有結合で結び付け不溶化する架橋法、高分子ゲルや半透膜などで包み込む包括法、脱水によりタンパクを急速に変性させ担体に固着させる方法等を挙げることができる。より具体的には、カルノア固定、アルコール固定、火焔固定、グルタルアルデヒド固定、乾燥固定、アセトン固定、メタノール固定、ホルマリン固定等を挙げることができる。

[0044] また、支持体の表面に試料を接着させることも固定に含まれる。したがって、支持担体の表面に接着性を高める物質、例えば、3-アミノプロピルトリエトキシシラン(APS)、ポリ-L-リジン、ゼラチン等をコートしておくことも可能である。このような処理を施した支持体を用いれば、試料の種類によっては十分に支持体に固着、保持させることができる。また、支持体に接着固定した上に、上記例示した固定方法を併用することも可能である。

[0045] (2) 核酸露出工程

核酸増幅工程において試料中に含まれる核酸を増幅するためには、プライマーや核酸合成酵素が標的核酸に到達できることが必須である。試料によっては標的核酸が試料表面に露出している場合もあり、このような試料については試料固定化工程から直接核酸増幅工程に進むことができる。したがって、本核酸露出工程は、本検出方法の必須の工程ではない。しかしながら、標的核酸が試料表面に露出していない場合には、核酸露出工程を設けて標的核酸を露出させることが必要となる。

[0046] 核酸露出工程に用いる方法としては、界面活性剤処理法(SDS、TRITON-X、TWEEN-20、BRIJ、NP-40、CHAPS等)、プロテアーゼ等の酵素処理、加熱処理法等

を挙げることができる。ただし、これらに限定されるものではなく、用いる試料および標的核酸に応じて、適宜最適な方法を選択すればよい。例えば、細菌感染に起因する敗血症で、白血球に貪食された細菌の遺伝子を検出する場合、細菌の細胞壁を消化させる酵素としてリゾスタфин、リゾチーム、N-アセチルムラミダーゼ、ザイモラーゼ等を使用することにより細菌、真菌等の微生物の遺伝子を露出させることができる。

[0047] (3)核酸増幅工程

核酸増幅工程は、試料が固定化された支持体上で標的核酸を増幅する工程である。ここで、本発明に係る核酸検出方法は、試料中の核酸を抽出、精製することなく、試料が固定化された支持体上で標的核酸の増幅を行うことに最大の特徴がある。これにより、標的核酸が試料中に微量しか存在しない場合においても、抽出および精製過程のロスが生じないため、検出感度の低下を招くことなく微量の標的核酸を検出することが可能となる。また、作業の簡便化を図ることができ、作業時間を短縮することが可能となる。

[0048] 核酸増幅とは、標的核酸の任意の配列に対し特異的なプライマーまたはランダムな配列のプライマーと、DNAポリメラーゼまたはRNAポリメラーゼとを用いて、試料中の核酸を増幅させることを意味する。増幅方法としては、従来公知の増幅方法を好適に用いることができる。具体的には、例えば、PCR法、Nested-PCR法、RT-PCR法、ICAN法、UCAN法、LAMP法、プライマーエクステンション法、転写(トランスクリプション)、複製(レプリケーション)等を挙げることができる。

[0049] 上記例示した増幅方法の中でもPCR法は、本検出方法に用いる増幅方法として好適である。以下に、本検出方法の核酸増幅工程にPCR法を用いた場合について説明する。

[0050] PCR法とは、特定のDNA領域を挟んだ2種類のプライマーとDNA合成酵素(耐熱性DNAポリメラーゼ、以下適宜「Taqポリメラーゼ」と表記する。)によるDNA合成反応の試験管内における繰り返しで、その特定DNA領域を増幅する方法であり、遺伝子工学分野において一般的に用いられている周知技術である。PCR法にはNested-PCR法、RT-PCR法等も含まれる。

- [0051] Nested-PCR法とは、外側のプライマーと内側のプライマーを使って2段階のPCRを行う方法であり、目的とする領域からの最初の増幅産物を鑄型にして、最初に使用したプライマー位置より両側とも内側にプライマーを設定して行う方法である。Nested-PCRを用いることにより、1回目のPCRで標的核酸が検出可能な量まで十分増幅しない場合でも、2回目のPCRにより検出可能な量に増幅させることが可能となる。また、1回目のPCRで非特異的な増幅産物が生じた場合、これらの非特異的増幅産物は2回目のPCRにおけるプライマーに類似した配列を持つ確率が極めて低くなる。したがって、2回目のPCRでは標的の配列を有する断片のみを増幅する確率が高くなるため、非特異的増幅産物の発生による弊害を解消し、より正確に標的核酸を検出することが可能となる。
- [0052] RT-PCR法とは、mRNAに対してPCRを適用するための変法であり、PCRの前段階として、逆転写酵素を用いて逆転写反応を行う工程を含むPCR法である。本検出方法にRT-PCR法を用いれば、標的核酸をmRNAとすることが可能となる。すなわち、本検出方法を遺伝子発現の検出に応用することが可能となる。
- [0053] 上記[支持体]の項で述べたように、本検出方法では試料を固定化した支持体上でPCRを行うため、支持体は複数の分離した区画を有するものが好ましい。複数の分離した区画を有する支持体を用いた場合の具体的なPCRの手順としては、PCRミクスチャー(緩衝液、dNTPmix、Taqポリメラーゼ等を混合したもの)を支持担体上の各区画の試料に添加し、さらにプライマーを加えてPCR用遺伝子増幅機器(サーマルサイクラー)等を用いてPCRを行えばよい。プライマーについては、1つのPCRについて様々な標的核酸を特異的に増幅するプライマーセットを用いる。PCRの条件(反応液の量、酵素や基質の濃度、反応温度等)は特に限定されるものではなく、用いる試料および標的核酸に応じて、適宜最適な条件を選択すればよい。
- [0054] Nested-PCRを行う場合には、1回目のPCRを支持体上で行い、2回目のPCRはPCRチューブ等を用いて行えばよい。なお、2回目のPCRに用いるプライマーは、両側とも最初に使用したプライマー位置と同じ、または内側に設計しなければならない。
- [0055] PCRにより増幅される断片は、標的核酸が特異的に有する配列部分であることが

好ましい。試料に含まれる核酸は標的部分以外の部分が大多数であるため、標的微生物に特異的な配列部分にプライマーを設計しなければ、非特異的な増幅産物が生じる可能性が高くなる。したがって、標的核酸の特異的配列をあらかじめ調べておき、その配列部分を増幅するようにプライマーを設計することが重要である。

- [0056] 増幅される断片の長さは50bp～5,000bpの範囲内であることが好ましく、100bp～2,000bpの範囲内であることがより好ましい。この範囲を外れると、特異的な増幅産物を有効に得ることができなくなるおそれがある。
- [0057] 核酸増幅工程においては、増幅された核酸を標識することが好ましい。これにより、後段の判定工程を効率的に実施することができる。核酸の標識は増幅と同時または増幅後に行うことができる。標識手段としては、放射性標識、ハプテン(ビオチン、ジゴキシゲニン等)標識、蛍光標識等を挙げることができるが、これらに限定されるものではない。
- [0058] 核酸増幅方法として、核酸の増幅と同時にを行う場合は、前述のPCR法、Nested-PCR法、RT-PCR法、ICAN法、UCAN法、LAMP法、プライマーエクステンション法、転写(トランスクリプション)、複製(レプリケーション)等の増幅反応を行う際に、例えはジゴキシゲニンやビオチン等のハプテン、FITC、放射性同位体で標識されたヌクレオチドアナログを基質とすれば、増幅反応中に標的核酸を標識することができる。また、増幅反応の際、末端を標識したプライマーを使用することによっても、標的核酸を標識することができる。増幅反応後に標識する場合は、ニックトランスレーション法やランダムプライム法、プライマーエクステンション法、TdT法、5'カイネーション法等を用いることができる。この場合も標識されたヌクレオチドアナログを基質としたり、末端を標識したプライマーを使用することによって標識することができる。
- [0059] 核酸増幅工程において、標的核酸の任意の配列に対し特異的なプライマーを用いた場合には、既知の塩基配列を有する核酸断片を増幅することができる。一方、ランダムな配列のプライマーを用いた場合には、非特異的に核酸が増幅されるため、どのような塩基配列を有する核酸断片が生じるかは予想できない。核酸増幅工程において既知の塩基配列を有する核酸断片を増幅するように設計されたプライマーを用いた場合には、後述する判定工程において、塩基配列の確認や既知の塩基配列を

有する核酸断片とのハイブリダイゼーションにより、標的の核酸であるか否かを判定することができる。ランダムな配列のプライマーを用いた場合には、後述する判定工程において、DNAマイクロアレイ等を用いることにより、試料中に標的の核酸が含まれているか否かを判定することができる。

[0060] (4) 判定工程

判定工程は、核酸増幅工程で増幅された核酸が標的の核酸断片であるか否かを判定する工程である。本発明に係る核酸検出方法は、核酸を増幅した後に検出を行うため、標的核酸が微量であるため検出が困難となる問題は生じない。また、公知の方法を適宜選択して用いることができるので、判定に熟練を要することもない。

[0061] 判定には増幅された核酸断片の長さや塩基配列を確認することが含まれることはいうまでもないが、増幅されたDNA断片の転写産物であるRNAを確認することや、増幅された核酸断片に基づいて発現させたタンパク質を確認することも含まれる。判定工程で用いる方法の具体例としては、核酸(DNAまたはRNA)を確認する方法として、アガロースゲル電気泳動、定量PCR、シークエンス、ドットハイブリダイゼーション、DNAマイクロアレイ、サザン・ハイブリダイゼーション、ノーザン・ハイブリダイゼーション等を挙げることができ、タンパク質を確認する方法として、SDS-PAGE、ウエスタン・ブロッティング、質量分析法(MALDI-TOF-MS、LC-MS、LC-MS/MS等)等を挙げることができる。ただし、これらの方に限定されるものではなく、適宜適当な方法を選択して使用すればよい。

[0062] もっとも簡便な判定方法としては、アガロースゲル電気泳動を挙げができる。しかしながら、この方法は、試料から増幅された核酸断片の長さと、標的核酸のみを鑄型として増幅した場合の核酸断片の長さとを比較して、一致するか否かを確認するものであるため、非特異的な増幅産物が偶然類似する長さである場合に誤った結果(擬陽性)を導くことがあり得る。増幅された核酸が標的核酸と一致するか否かを正確に判定するために最も信頼性が高い方法は、増幅核酸の塩基配列を確認する方法(シークエンス)である。この方法を用いれば、SNP(single nucleotide polymorphism)を検出することも可能となる。

[0063] 標的核酸が増幅されているか否かを簡便かつ正確に判定する方法として、標識さ

れた増幅核酸をプローブとし、当該プローブと既知の遺伝子断片との相補的なハイブリダイゼーションを指標として標的核酸であるか否かを判定する方法を用いることが好ましい。また、この方法を用いる場合、プローブとする核酸は、ハイブリダイゼーションの対象とする上記既知の遺伝子断片の塩基配列を有するように設定されたプライマーを用いて増幅されることが好ましい。さらに、ハイブリダイゼーションの対象とする上記既知の遺伝子断片はあらかじめ支持体に固定されていることが好ましい。あらかじめ既知の遺伝子断片を支持体に固定することにより、プローブとのハイブリダイゼーションを正確に捕捉できる。また、既知の遺伝子断片に位置情報を持たせることができ可能となり、様々な既知の遺伝子断片を整列させることにより、一度に多数の遺伝子を検出し得る。

- [0064] 具体的には、例えば標的核酸をあらかじめナイロンメンブレン等にスポット(固定)しておき、増幅された核酸をプローブとしてハイブリダイゼーションさせる。スポットされた核酸と増幅された核酸との間にハイブリダイゼーションが成立すれば、試料中に標的の核酸が存在していたと判定することができる。一方、核酸増幅工程において核酸が増幅されていない場合や、標的の核酸でない核酸が非特異的に増幅されていた場合はハイブリダイゼーションが成立せず、試料中に標的の核酸が存在していたと判定することができる。
- [0065] ハイブリダイゼーションの対象とする上記既知の遺伝子断片は、核酸増幅工程により増幅される予定の塩基配列部分を含んでいれば特に限定されるものではないが、増幅される予定の塩基配列部分のみ、または増幅される予定の塩基配列部分の一部であることが好ましい。増幅される予定の塩基配列部分以外の塩基配列配列を含んでいる場合には、増幅された核酸が目的の配列を有しない非特異的増幅産物であった場合に、ハイブリダイズする可能性があるからである。
- [0066] ハイブリダイゼーションは、既知の遺伝子断片に対して標識された増幅核酸をプローブとして、公知の方法により行えばよい。公知の方法としては、例えば、J. Sambrook et al. Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Third Edition, Cold Spring Harbor Laboratory (2001) に記載されている方法等を挙げることができるが、これ限定されるものではない。

[0067] また、核酸増幅工程で増幅かつ標識された核酸をプローブとし、DNAマイクロアレイを用いて標的核酸の存在の有無を判定する方法を用いることもできる。ここで、DNAマイクロアレイには、いわゆるオリゴDNAタイプのものとcDNAタイプのものとのいずれをも含むものとする。また、DNAマイクロアレイは市販のものを用いてもよく、自製のものを用いてもよい。判定工程においてDNAマイクロアレイを用いる場合には、上述したように、核酸増幅工程においてランダムな配列のプライマーを用いて非特異的に増幅された核酸中に標的核酸が存在するか否かを判定することができる。

[0068] (5)本発明に係る核酸検出方法の適用範囲

本検出方法の適用範囲としては、従来の遺伝子診断と言われる分野すべてに適用可能である。例示すれば以下のとおりであるが、これらに限定されるものではない。

- a) 病原微生物(細菌、真菌、ウイルス、寄生虫等)の検出、すなわち感染症の分子診断
- b) がんの分子診断
- c) 出生前の遺伝性疾患等の分子診断
- d) 薬物代謝に関する遺伝子の分子診断
- e) 法医学サンプルからの分子診断
- f) 疾病マーカー遺伝子の分子診断
- g) 移植時の組織タイピング
- h) 適合性テスト
- i) SNPs検出

本発明に係る核酸検出方法は、上記a)に示した感染症の分子診断に用いることが最適であると考えられる。その理由を以下に説明する。

[0069] 病原微生物は血液中または体液中に浮遊して存在している可能性は低く、宿主細胞に侵入してはじめて感染症を発症させる。したがって、感染症の病原微生物を検出するための試料としては白血球等の免疫系細胞が好適であるといえる。そして、細胞に食食された細菌や細胞に侵入したウイルス等を検出する手段としては、試料から核酸を抽出した後に増幅する従来のPCR法や、核酸を増幅することなく標的核酸の検出を行うISH法では十分な検出感度、再現性、簡便性等を実現できない場合が

ある。一方、本発明に係る核酸検出方法では、細菌を貪食した細胞やウイルス等が侵入した細胞を直接支持体に固定化し、そのままの状態で細胞中の細菌やウイルス等の核酸を増幅して検出するものであるため、上記従来の方法と比較して顕著に検出感度および精度が向上することは明らかである。

- [0070] また、従来細胞内の病原微生物等を検出する方法としてin situ PCR法がある。この方法は、細胞をスライドグラスに固定化し、細胞内でPCRを行い、細胞内で増幅した産物をISH法によりプローブをハイブリダイゼーションさせて視覚化し、顕微鏡で検出するものである。したがって、in situ PCR法は本発明に係る核酸検出方法と同等の検出感度が期待できるが、条件設定が難しく、再現性に乏しいという問題点がある。さらに、非特異的反応が多く、非特異的増幅産物を標的の特異的増幅産物と細胞内で区別することは困難であるという問題点がある。
- [0071] 以上より、本発明に係る核酸検出方法は、細胞に貪食された細菌や細胞に侵入したウイルス等を検出する手段として非常に優れた方法であるといえる。

## [0072] 2. 本発明に係る遺伝子検出キット

本発明に係る遺伝子検出キット(以下、適宜「本キット」と略記する。)は、本発明に係る核酸検出方法を用いて試料中の標的遺伝子を検出するために用いるキットである。本検出方法に用いる試薬、器具類をキット化することにより、本検出方法を簡便に実施することが可能となり、一層短時間で正確な検出結果を得ることが可能となる。なお、遺伝子にはDNAおよびRNAが含まれる。

### [0073] (1) 本キットの構成

本キットには、少なくとも試料固定化工程で使用する試料固定化用支持体、核酸増幅工程で使用するプライマー、核酸合成酵素、基質(ヌクレオシド三リン酸)、緩衝液等の試薬、判定工程で使用する増幅核酸検出用指示薬等の試薬および器具等が含まれていることが好ましい。また、用いる試料を特定したキットとすることにより核酸露出工程が必要である場合には、核酸露出用の試薬(界面活性剤やタンパク質分解酵素等)を含ませることができる。また、用いる試料に適した固定用試薬を含ませることができる。例えば、白血球を含む生体由来試料に特定し、白血球に貪食された細菌等の微生物のゲノムを標的核酸とするキットの場合には、固定用試薬(例えば、

カルノア固定液等)および核酸露出用試薬(微生物の細胞壁分解酵素等)を含ませることが好ましい。

- [0074] さらに、核酸増幅方法および判定方法を特定することにより、キットに含まれる試薬の構成を具体化することが可能となる。例えば、核酸増幅方法をPCR法とする場合は、核酸増幅工程で用いる試薬はPCR反応用緩衝液、デオキシヌクレオシド三リン酸混合液、耐熱性DNA合成酵素(Taqポリメラーゼ)となる。また、PCRにより核酸を標識する必要であれば、さらに標識デオキシヌクレオシド三リン酸を含ませればよい。
- [0075] 判定方法をアガロースゲル電気泳動法とする場合は、アガロースゲル、電気泳動用緩衝液、分子量マーカー、核酸染色用試薬等をキットに含ませればよい。判定方法をドットハイブリダイゼーションとする場合は、標的核酸をスポット(固定)したメンブレン、ハイブリダイゼーション用緩衝液、核酸の標識に応じた検出用指示薬(例えば、ジゴキシゲニン標識を用いた場合には酵素標識した抗ジゴキシゲニン抗体、標識した酵素を発色させるための基質等)、ハイブリバッギング、その他必要な試薬、器具等をキットに含ませればよい。核酸検出方法をDNAマイクロアレイとする場合は、標的核酸に応じたDNAマイクロアレイおよび必要な試薬、器具等をキットに含ませればよい。
- [0076] すなわち、本発明に係る核酸検出方法に用いる試料、標的遺伝子、核酸増幅方法、核酸検出方法を具体的に特定することにより、用いる試薬、器具等を様々な組み合わせてキットを構成することが可能となる。なお、本キットの構成は上記例示した試薬、器具等に限定されるものではなく、目的に応じて適当な公知の試薬、器具等を適宜選択して用いればよい。

[0077] (2) 標的遺伝子

一つのキットに含まれる標的遺伝子は1遺伝子に限定する必要はなく、複数のプライマーセットをキットに含ませることにより、複数の標的遺伝子を検出可能なキットとすることができる。例えば、疾病関連遺伝子を標的とするキットには、同一の試料から検出することが可能な複数の疾病関連遺伝子を標的とできる。より具体的には、感染症の原因微生物の遺伝子を標的とする場合には、黄色ブドウ球菌、表皮ブドウ球菌、

緑膿菌、腸球菌、大腸菌等を特異的に検出可能なプライマーセットをキットに含ませればよい。このような感染症の原因微生物の標的遺伝子としては、薬剤耐性遺伝子や感受性遺伝子であることが好ましい。

- [0078] また、癌マーカー遺伝子を標的とする場合には、p53、MDM2、H-ras、K-ras、N-ras、APC、Myc、HER2/neu、BRCA1、BRCA2、erbB、src、fos、jun、raf、fes、erb-A、fms、sis、Rb、WT1等を特異的に検出可能なプライマーセットをキットに含ませればよい。また、遺伝性疾患関連遺伝子を標的とする場合には、例えば、色素性乾皮症関連遺伝子(XPA、XPB、XPC、XPD、XPE、XPF/ERCC1、XPV)、家族性大腸癌関連遺伝子(APC)、アルツハイマー病関連遺伝子(apoE4)、冠状動脈性疾患関連遺伝子(apoE2)、Von Hippel-Lindau病関連遺伝子(VHL)、筋ジストロフィー関連遺伝子(ジストロフィン)等を特異的に検出可能なプライマーセットをキットに含ませればよい。
- [0079] なお、本キットの適用範囲は上記「1. (5)本発明に係る核酸検出方法の適用範囲」と同一であり、従来の遺伝子診断と言われる分野すべてに適用可能である。したがって、本キットの標的遺伝子はあらゆる遺伝子診断の分野から選択することが可能であり、上記例示したものに限定されるものではない。
- [0080] 以下、実施例により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。
- [0081] <実施例1. 貪食サンプルを用いた核酸の検出>
- 〔試料調製〕
- 予め外来微生物(黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*、以下SA)ATCC 126000、表皮ブドウ球菌(*Staphylococcus epidermidis*、以下SE)ATCC 14990、緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*、以下PA)ATCC 10145、腸球菌(*Enterococcus faecalis*、以下EEF)ATCC 19433、大腸菌(*Escherichia coli*、以下EC)ATCC 11775)をブレインハートインキュージョン(BHI)培養液(DIFCO)に植菌し、37°Cで8時間以上培養した。
- [0082] 培養した菌液を、4°C、2,000×gで10分間遠心分離して集菌した。上清を捨てた後、菌のペレットをPBS 5mLを用いて懸濁し、再度4°C、2,000×gで10分間遠心分離して集菌した。集菌した菌をPBS 5mLで懸濁した後、PBSにて希釈して吸光度計により

菌液の濁度(OD=600nm)を、0.01～0.03に調整したものを15mL作製した。作製した菌液を別々の175cm<sup>2</sup>の培養用フラスコに移し、約30分間室温にて静置した。

- [0083] ～ヘパリン加健常ヒト血液50mLを採取し、血液分離試薬(塩化ナトリウム225mgおよびデキストラン(MW200,000～300,000)1.5gを滅菌精製水で溶解し、25mLにメスアップしたもの)を約4:1の割合で加え、37°C(20～40°C)で30分間静置し、白血球画分を分取した。分取した白血球画分をPBSにて50mLにした。
- [0084] 上記菌液を入れて静置した培養用フラスコの上清を静かに捨て、上記PBSで希釈した白血球画分を10mLずつフラスコに加え、室温で約10分間静置した。フラスコ内の上清を捨て、フラスコの底に付着した白血球を0.02%EDTA含有PBS10mLで15mLの遠沈管に回収し、4°Cにて、140×g～180×gで10分間遠心分離し、白血球を収集した。収集した白血球中に赤血球の混入が認められる場合には、滅菌精製水1mLにて白血球の沈渣を穏やかに懸濁して溶血させた後、PBS14mLを加えて等張化した後、再度4°Cにて、140×g～180×gで10分間遠心分離を行い、白血球を収集した。
- [0085] 収集した白血球をPBSで懸濁し、血球計算盤にて細胞数を計測し、 $1 \times 10^4$ 個/ $\mu\text{L}$ ～ $5 \times 10^4$ 個/ $\mu\text{L}$ に調整した。このサンプルを貪食サンプルと称し、本実施例の試料とした。
- [0086] [試料固定化工程]  
上記各貪食サンプルを支持体として用いたTopYield strips(NUNC:248909)の各ウェルにそれぞれ5 $\mu\text{L}$ ずつスメアし、風乾した。各ウェルに100 $\mu\text{L}$ の75%エタノールを注ぎ5分間固定および脱塩した。その後、75%エタノールを廃棄し、サーマルサイクラーを用いて風乾した。
- [0087] [核酸増幅工程]  
Nested-PCR法を用いて標的核酸の増幅を行った。まず、各貪食サンプルが固定化されたウェルにPCR関連試薬(1ウェルあたりTaKaRa Ex Taq (5units/ $\mu\text{L}$ ):0.5 $\mu\text{L}$ (final 2.5U)、10× Ex Taq Buffer:5 $\mu\text{L}$ 、dNTP mixture(各2.5mM):4 $\mu\text{L}$ 、各細菌識別プライマー2種:0.4 $\mu\text{M}$ 、滅菌精製水:up to 50 $\mu\text{L}$ )を加えた。1回目のPCR用プライマーには、SA識別プライマーとして以下に示すSA1T(配列番号1)およびSA1B(配列番号2)を使用した。

SA1T : 5'-GAGGATGCAGCGAATTAAACAAACGTACTGCTGTTAACGC-3'

SA1B : 5'-AATGAAACTTACCAACAATTGGTCTTCATCAATGAGGC-3'

SE識別プライマーとして以下に示すSE1T(配列番号5)およびSE1B(配列番号6)を使用した。

SE1T : 5'-ACTGGAATAATCATTGGTATTATTGCTTAATTCTAGTAA-3'

SE1B : 5'-CTAACAAAATCTAAGTAGAGTTCAGGAATTTCTGGTT-3'

PA識別プライマーとして以下に示すPA1T(配列番号9)およびPA1B(配列番号10)を使用した。

PA1T : 5'-ACCTTGCCGATGATCAGGTCGAGCAGCAGCAGTTCCGCCG-3'

PA1B : 5'-GTGTTCACCGGCTCCACCGAGGTCGGCAAGTACTTCATGC-3'

EF識別プライマーとして以下に示すEF1T(配列番号13)およびEF1B(配列番号14)を使用した。

EF1T : 5'-CTTTGCTAGTCATGTTATTGATTTCGTTGATTAT-3'

EF1B : 5'-TACCATTCTTGCATGCTCATTTCTCCTTACTACTGAAAC-3'

EC識別プライマーとして以下に示すEC1T(配列番号17)およびEC1B(配列番号18)を使用した。

EC1T : 5'-CATTGTGAATGAGATGCACTGACTAAATCAATTGGCCCC-3'

EC1B : 5'-CCGAGATGGGCTTCACCTGTCTCGTATTCCATTGCCTG-3'

サーマルサイクラーはGeneAmp PCR System9700(PE Applied Biosystems)を使用し、94°Cで1分間保持した後、94°Cで1分間、68°Cで3分間の反応を50サイクル繰り返し、72°Cで1分保持して1回目のPCRを終了した。

[0088] 2回目のPCR(Nested-PCR)は、上記組成のPCR関連試薬の入ったPCRチューブに、1回目のPCR反応液5 μLを加えて行った。2回目のPCR用プライマーには、SA識別プライマーとして以下に示すSA2T(配列番号3)およびSA2B(配列番号4)を使用した。

SA2T : 5'-TGTTCAACGCTTGATTAGTTTATT-3'

SA2B : 5'-TCAATGAGGCCAACGCACGGCTAT-3'

SE識別プライマーとして以下に示すSE2T(配列番号7)およびSE2B(配列番号8)を

使用した。

SE2T : 5'-ATTCTAGTAATTATGCAAGGGTTTC-3'

SE2B : 5'-TTTTCTGGTCTCGATATGTGGTG-3'

PA識別プライマーとして以下に示すPA2T(配列番号11)およびPA2B(配列番号12)を使用した。

PA2T : 5'-AGTTCCGCCGAGAGGGCGAACATCG-3'

PA2B : 5'-TACTTCATGCAGTATTCCGCGCAAT-3'

EF識別プライマーとして以下に示すEF2T(配列番号15)およびEF2B(配列番号16)を使用した。

EF2T : 5'-GTTCGATTATCCCACAAGATTATAT-3'

EF2B : 5'-CTACTGAAACATCGTCTTAAAAAAA-3'

EC識別プライマーとして以下に示すEC2T(配列番号19)およびEC2B(配列番号20)を使用した。

EC2T : 5'-AATTGGCCCCAACTGGTGTACCCC-3'

EC2B : 5'-CCATTGCCTGGCGCGAATTTCccc-3'

サーマルサイクラーは1回目と同様にGeneAmp PCR System9700(PE Applied Biosystems)を使用し、94°Cで1分間保持した後、94°Cで1分間、68°Cで1分間の反応を30サイクル繰り返し、72°Cで1分保持して2回目のPCRを終了した。

[0089] [判定工程]

1%アガロースゲル電気泳動(アガロース:Agarose-RE for  $\geq 1\text{Kbp}$  fragment, for Restriction and Ligation(nacalai tesque))により、増幅したPCR産物を分離し、エチジウム・プロマイドにより染色した。使用した各細菌を鋳型として同一のプライマーを用いて行ったPCRの結果と比較することにより、標的核酸が増幅されているか否かを確認した。

[0090] [結果]

結果を図2に示した。左側が各細菌を鋳型としてPCRを行った結果を示したものであり、右側が各貪食サンプルを試料として本発明にかかる核酸検出方法を用いて各細菌の標的核酸を増幅した結果を示したものである。図中のMは分子量マーカーを

表し、左端の数値は分子量(bp)を示している。図1から明らかなように、貪食サンプルの2回目のPCR(2 ND-PCR(nested))のバンドの位置は、各細菌を鋳型としてPCRを行った場合の2回目のPCR(2 ND-PCR(nested))のバンドの位置と同一であり、標的の核酸が検出されたことを示している。

[0091] <実施例2. 敗血症患者からの起因菌の判定>

[試料調製]

敗血症が疑われる患者より、血液5mLを採取し、ヘパリンを加えた(ヘパリン加血液)。ヘパリン加血液に血液分離試薬(塩化ナトリウム225mg、デキストラン(MW200,000～300,000)1.5gを滅菌精製水で溶解し、25mLにメスアップしたもの)を約4:1の割合で加え、37°C(20～40°C)で30分間静置し、白血球画分を分取した。4°Cにて140～180×gで10分間遠心分離し、白血球を収集した。収集した白血球中に赤血球の混入が認められる場合には、滅菌精製水1mLにて白血球の沈さを穏やかに懸濁して溶血させた後、PBS 14mLを加えて等張化した後、再度4°Cにて140～180×gで10分間遠心分離し、白血球を収集した。収集した白血球をPBS 150 μLで懸濁した。これを臨床検体と称し、試料とした。

[0092] [試料の固定化]

上記試料を支持体として用いたTopYield strips(NUNC:248909)の各ウェルにそれぞれ5 μLずつスマearerし、サーマルサイクラー(GeneAmp PCR System9700(PE Appleid Biosystems))を用いて42°Cで風乾した。各ウェルに100 μLの75%エタノールを注ぎ5分間固定および脱塩した。その後、75%エタノールを廃棄し、サーマルサイクラーを用いて42°Cで風乾した。

[0093] [試料の前処理(核酸露出工程)]

各ウェルに酵素試薬(サポニン125 μg、t-オクチルフェノキシポリエトキシエタノール(比重1.068～1.075(20/4°C), pH(5w/v%)5.5～7.5)125nL、N-アセチルムラミダーゼ(生化学工業社製)50単位、リゾチーム(生化学工業社製)5000単位、リゾスタфин(SIGMA社製)5単位を滅菌精製水1mLに溶かして調製したもの)10 μLを入れ、サーマルサイクラーを用いて、37°Cにて10分処理後、95°Cにて10分間処理し酵素の失活およびウェルを風乾させた。

[0094] ただし、N-アセチルムラミダーゼは、*S. salivarius* IF03350の熱処理細胞を37°C、pH7.0で1分間に1  $\mu$  g溶菌する酵素活性を1単位とした。リゾチームは、*M. luteus*を35°C、pH6.2で1分間に540nmの吸収を0.001下げるときの酵素活性を1単位とした。リゾスタфинは、*S. aureus*を37°C、pH7.5で10分間に620nmの吸収を0.240から0.125に下げるときの酵素活性を1単位とした。

[0095] [核酸増幅工程]

Nested-PCR法を用いて標的核酸の増幅を行った。まず、試料が固定化されたウェルにPCR関連試薬(1ウェルあたりTaKaRa LA Taq : 0.2  $\mu$  L、10× LA Taq Buffer : 2  $\mu$  L、25mM MgCl<sub>2</sub> : 2  $\mu$  L、dNTP mixture (各2.5mM) : 3.2  $\mu$  L、各細菌識別プライマー2種：各0.16  $\mu$  M、滅菌精製水で20  $\mu$  Lに調整した)を加えた。

[0096] 1回目のPCR用プライマーには、上記実施例1で使用したプライマーと同一のプライマーを使用した。すなわち、SA識別プライマーとしてSA1T(配列番号1)およびSA1B(配列番号2)を使用した。SE識別プライマーとしてSE1T(配列番号5)およびSE1B(配列番号6)を使用した。PA識別プライマーとしてPA1T(配列番号9)およびPA1B(配列番号10)を使用した。EF識別プライマーとしてEF1T(配列番号13)およびEF1B(配列番号14)を使用した。EC識別プライマーとしてEC1T(配列番号17)およびEC1B(配列番号18)を使用した。

[0097] サーマルサイクラーはGeneAmp PCR System9700(PE Appleid Biosystems)を使用し、94°Cで1分間保持した後、98°Cで20秒、68°Cで3分間の反応サイクルを30サイクル繰り返し、72°Cで5分保持して1回目のPCR反応を終了した。

[0098] 2回目のPCR(Nested-PCR)は、上記組成のPCR関連試薬の入ったPCRチューブに、1回目のPCR反応液1  $\mu$  Lを加えて行った。2回目のPCR反応には以下のプライマーを使用した。

SA識別プライマー

SA3T : 5'-ACTGTTCGTACAAACTTTGTAATAGTTGGTCATG-3' (配列番号21)

SA3B : 5'-CTCGGCCATCTTCAAAGTTGGATCCATTGATTCAC-3' (配列番号22)

SE識別プライマー

SE3T : 5'-GGTATATAAATGACTAAAGGGAGGTGCCAAGATGA-3' (配列番号23)

SE3B : 5'-GCAATGCACGTACTGCAATTGCACTTCTTCCGGAG-3' (配列番号24)

PA識別プライマー

PA3T : 5'-ATTCGATCGTCCTTTGTTGTCGTTATCGGCATCG-3' (配列番号25)

PA3B : 5'-TGGTGGAGCGTTCGATCCACGACGAGTTCGTCGAG-3' (配列番号26)

EF識別プライマー

EF3T : 5'-ATCAGGGCGTATCCATTATTGGATTAACCACGATTG-3' (配列番号27)

EF3B : 5'-TTGCTCCTGACGATATTACGATTCCCTAAAATCC-3' (配列番号28)

EC識別プライマー

EC3T : 5'-AGATGCGGATTGGGGATCATATTCACTATGTTGCC-3' (配列番号29)

EC3B : 5'-GATCACTTCGAACATTACGCCCGCACGGTCTTAC-3' (配列番号30)

サーマルサイクラーは1回目と同様にGeneAmp PCR System9700(PE Applied Biosystems)を使用し、94°Cで1分間保持した後、98°Cで20秒、68°Cで1分間の反応サイクルを30サイクル繰り返し、72°Cで5分保持して2回目のPCR反応を終了した。

[0099] [判定工程]

1%アガロースゲル電気泳動(アガロース:Agarose-RE for  $\geq 1\text{Kbp}$  fragment, for Restriction and Ligation(nacalai tesque))により、増幅したPCR産物を分離し、エチジウム・プロマイドにより染色した。使用したプライマーに対応した各細菌を鋳型としてPCR反応を行い、標的核酸が増幅されていることを確認した(ポジティブ・コントロー

ル)。また、試料をスメアーしない状態でPCR反応を行い、標的核酸が非特異的に増幅していないことを確認した(ネガティブ・コントロール)。

[0100] [結果]

電気泳動の結果を図3に示した。図中の左端の数値は分子量(bp)を示している。図3から明らかなように、レーン13およびレーン15に特異的な核酸の増幅が認められるため、この臨床検体はSA(黄色ブドウ球菌)およびPA(緑膿菌)に感染している(陽性)と判定した。

[0101] なお、この臨床検体(臨床検体1)を含めて4例の臨床検体について、上記と同一の方法で起因菌を判定した結果を表1に示す。

[0102] [表1]

	SA	SE	PA	EF	EC	血液培養
臨床検体 1	陽性	陰性	陽性	陰性	陰性	陰性
臨床検体 2	陰性	陰性	陽性	陰性	陰性	陰性
臨床検体 3	陰性	陰性	陽性	陰性	陰性	陰性
臨床検体 4	陽性	陰性	陽性	陰性	陰性	陰性

表1から明らかなように、本発明の核酸検出方法は、敗血症患者の起因菌の判定に有効であることが示された。

[0103] <実施例3. 敗血症血液モデルからの生体因子(RNA)の検出>

[敗血症血液モデルの調製]

予め外来微生物(大腸菌(*Escherichia coli*、以下EC) ATCC11775)をブレインハートインフュージョン(BHI)培養液(DIFCO)に植菌し、37°Cで8時間以上培養した。培養した菌液を4°C、2000×gで10分間遠心分離して集菌した。上清を捨てた後、菌のペレットをPBS 5mLを用いて懸濁し、再度4°C、2000×gで10分間遠心分離して集菌した。集菌した菌をPBS 5mLで懸濁した後、PBSにて希釈して吸光度計により菌液の濁度(OD=600nm)を、0.1～0.15に調整したものを5mL作製した。ヘパリン加健常ヒト血液8mLを採取し、15mLの遠沈管2本に4mLずつ分注した。ヘパリン加血液4mLを作製した菌液及びPBSを400 μL加え、37°Cで3時間静置し、炎症性サイトカインの発現を誘導した。

[0104] 上記ヘパリン加血液に血液分離試薬(塩化ナトリウム225mg、デキストラン

(MW200,000～300,000)1.5gを滅菌精製水で溶解し、25mLにメスアップしたもの)を約4:1の割合で加え、37°C(20～40°C)で30分間静置し、白血球画分を分取した。4°Cにて140～180×gで10分間遠心分離し、白血球を収集した。収集した白血球中に赤血球の混入が認められる場合には、滅菌精製水1mLにて白血球の沈さを穏やかに懸濁して溶血させた後、PBS14mLを加えて等張化した後、再度4°Cにて140～180×gで10分間遠心分離し、白血球を収集した。収集した白血球をPBS150 μLに懸濁した。これを敗血症血液モデルとし、試料とした。

[0105] [試料の固定化]

上記試料を支持体として用いたTopYield strips(NUNC:248909)の各ウェルにそれぞれ5 μLずつスマearerし、サーマルサイクラー(GeneAmp PCR System9700(PE Appleid Biosystems))を用いて70°Cで風乾した。各ウェルに100 μLの75%エタノールを注ぎ5分間固定および脱塩した。その後、75%エタノールを廃棄し、サーマルサイクラーを用いて42°Cで風乾した。

[0106] [試料の前処理]

各ウェルにDNA分解酵素(DNaseI,RNase-free (Roche Diagnostics GmbH社製) 0.1単位/μL、Tris-HCl 10mM、MgCl<sub>2</sub> 10mM、DTT 1mM、滅菌蒸留水)10 μLを入れ、サーマルサイクラーを用いて37°Cにて10分処理し白血球ゲノムDNAを分解した後、70°Cにて10分間処理し酵素の失活およびウェルを風乾させた。

[0107] ただし、仔牛胸腺DNAを基質として、25°C、pH5.0において反応液の260nmの吸光度を1分間に0.001増加させる酵素活性を1単位とした。

[0108] [核酸增幅工程]

RT-PCR法を用いて標的核酸の増幅を行った。まず、逆転写反応(reverse transcription;RT)を行った。逆転写反応にはスーパースクリプト ファーストストランドシステム(RT-PCR用)(Invitrogen)を使用した。試料が固定化されたウェルにOligo(dT)12-18(0.5 μg/ μL):1 μLと滅菌蒸留水:9 μLとを加え70°Cで10分間処理後、4°Cにて1分間静置した。次に10× PCR buffer[200mM Tris-HCl(pH 8.4), 500mM KCl]: 2 μL、25mM MgCl<sub>2</sub>: 2 μL、10mM dNTP mix: 1 μL、0.1M DTT: 2 μLを加えて25°Cにて5分間静置した。その後、SuperScript II RT: 1 μL(50 units)を加えて25°C

にて10分、42°Cで50分、70°Cで15分間処理後、4°Cにて5分間静置した。逆転写反応終了後、E.coli RNaseH (2 units/  $\mu$  L): 1  $\mu$  Lを加え37°Cにて20分間処理し、RNAを完全に分解した。

[0109] PCR反応は、PCR関連試薬(1ウェルあたりTaKaRa LA Taq : 0.2  $\mu$  L, 10× LA Taq Buffer : 2  $\mu$  L, 25mM MgCl<sub>2</sub> : 2  $\mu$  L, dNTP mixture (各2.5mM) : 3.2  $\mu$  L, IL6識別プライマー : 各0.16  $\mu$  M、滅菌精製水で18  $\mu$  Lに調整した)の入ったPCRチューブに、逆転写反応液2  $\mu$  Lを加えて行った。

[0110] なお、PCR反応には以下のインターロイキン6(IL6)用プライマーを使用した。

IL6識別プライマー

IL6-T : 5'-ATGAACTCCTTCTCCACAAGCGCCTTCGG-3' (配列番号31)

IL6-B : 5'-ATTCTTGCCTTTCTGCAGGAAGTGGAT-3' (配列番号32)

サーマルサイクラーはGeneAmp PCR System9700(PE Appleid Biosystems)を使用し、94°Cで1分間保持した後、94°Cで30秒、55°Cで30秒、72°Cで30秒間の反応サイクルを50サイクル繰り返し、72°Cで5分保持してPCR反応を終了した。

[0111] [判定工程]

2%アガロースゲル電気泳動(アガロース:Agarose-RE for  $\geq$  1Kbp fragment, for Restriction and Ligation(nacalai tesque))により、増幅したPCR産物を分離し、エチジウム・プロマイドにより染色した。電気泳動で特異的バンドが得られることにより、標的核酸が増幅されていることを確認した。

[0112] [結果]

電気泳動の結果を図4に示した。図中の左端の数値は分子量(bp)を示している。図4から明らかなように、レーン3にIL6由来の特異的な核酸の増幅が観察されるため、大腸菌に感染した血液でのIL6の発現上昇が、本発明の核酸検出方法により検出可能であることが証明された。

[0113] なお、発明を実施するための最良の形態の項においてなした具体的な実施態様または実施例は、あくまでも、本発明の技術内容を明らかにするものであって、そのような具体例にのみ限定して狭義に解釈されるべきものではなく、本発明の精神と次に記載する請求の範囲内で、いろいろと変更して実施することができるものである。

## 産業上の利用の可能性

- [0114] 本発明に係る核酸検出方法は、細胞を含む試料を支持体に固定する試料固定化工程と、試料中の核酸を支持体上で増幅する核酸増幅工程と、増幅された核酸を検出する核酸検出工程とを含むものであり、試料から核酸を抽出する工程を必要としない。したがって、核酸の抽出に起因する核酸のロスがほとんど生じず、試料中に含まれる標的核酸が非常に微量であっても増幅するための鑄型として必要な量の標的核酸が含まれていれば検出することができるという効果を奏し、それに伴い、再現性および検出精度が向上するという効果を奏する。また、試料から核酸を抽出する工程を必要としないため、操作が簡便となり、結果を得るまでに要する時間を短縮できるという効果を奏する。
- [0115] 本発明に係る核酸検出方法は、試料を支持体に固定するため、試料溶液中に増幅阻害物質が含まれている場合でも、細胞外に存在する増幅阻害物質は容易に除去することができる。したがって、増幅効率の低下に伴う検出感度の低下を招かないという効果を奏する。
- [0116] 本発明に係る核酸検出方法は、試料を支持体に固定し、当該支持体上で核酸を増幅するため、試料をPCRチューブ等の別の容器等に移す必要がない。したがって、試料の移動に起因する核酸のロスが生じないため、検出感度の低下を招かないという効果を奏する。また、操作が簡便となり、要する時間を短縮できるという効果を奏する。
- [0117] 本発明に係る核酸検出方法は、核酸を増幅した後に検出を行うため、検出対象の標的核酸が微量であるために検出が困難であるという問題は生じない。したがって、再現性および検出精度が向上するという効果を奏する。また、検出方法に特別な工夫を必要としないため、公知の検出方法を適宜選択して用いることができるという効果を奏する。さらに、結果の判定に熟練を必要としないという効果を奏する。
- [0118] 本発明に係る遺伝子検出キットは、本発明に係る核酸検出方法を用いて試料中の標的遺伝子を検出するためのキットである。したがって、当該キットを用いることにより、本発明に係る核酸検出方法を非常に簡便かつ迅速に実施することができるという効果を奏する。

[0119] 以上のように本発明は、従来の遺伝子診断と言われる分野すべてに適用可能である。したがって、本発明は医療、製薬、試薬分野をはじめ、広く生物関連産業に利用することができる。特に、本発明を医療分野における臨床検査で利用することにより、的確な治療方針の選択に貢献できる。また、生物関連分野の基礎研究に利用することができ、生物学の発展に大いに貢献することが期待される。

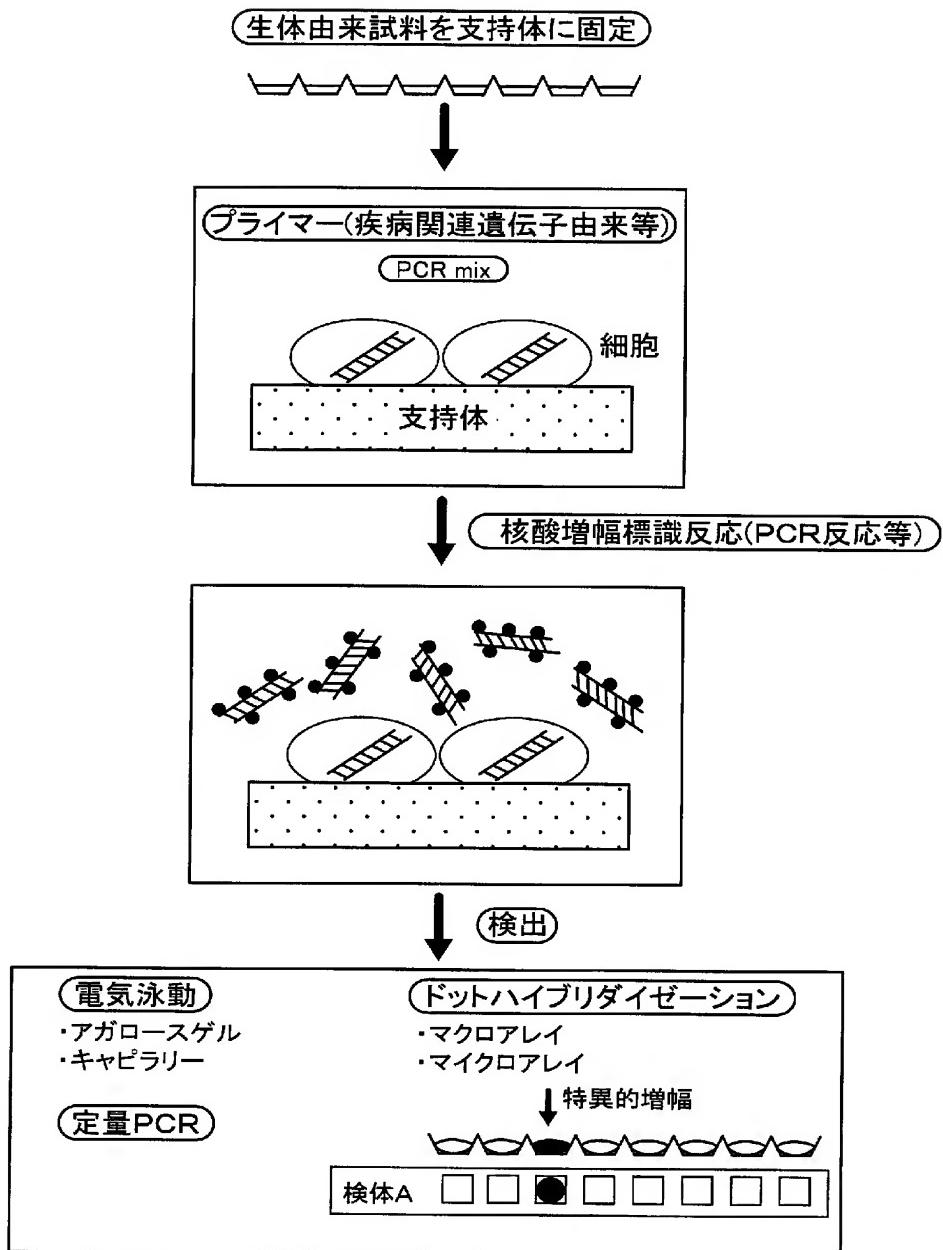
## 請求の範囲

- [1] 細胞を含む試料を支持体に固定する試料固定化工程と、試料中の核酸を支持体上で増幅する核酸増幅工程と、増幅された核酸が標的の核酸であるか否かを判定する判定工程とを含むことを特徴とする核酸検出方法。
- [2] 上記核酸増幅工程の前段に、試料に含まれる核酸を露出させる核酸露出工程を含むことを特徴とする、請求項1に記載の核酸検出方法。
- [3] 上記核酸露出工程における核酸露出方法として、界面活性剤処理法、酵素処理法または加熱処理法のいずれか1の方法、あるいは2以上の方法を組み合わせて用いることを特徴とする請求項2に記載の核酸検出方法。
- [4] 上記核酸増幅工程における核酸増幅方法として、PCR(ポリメラーゼ連鎖反応)法を用いることを特徴とする請求項1ないし3のいずれか1項に記載の核酸検出方法。
- [5] 上記核酸増幅工程において増幅された核酸を標識することを特徴とする請求項1ないし4のいずれか1項に記載の核酸検出方法。
- [6] 上記判定工程における判定方法として、核酸増幅工程で増幅かつ標識された核酸をプローブとし、当該プローブと既知の遺伝子断片との相補的なハイブリダイゼーションを指標として標的の核酸であるか否かを判定することを特徴とする請求項5に記載の核酸検出方法。
- [7] 上記既知の遺伝子断片は、あらかじめ支持体に固定されていることを特徴とする請求項6に記載の核酸検出方法。
- [8] 上記判定工程における判定方法として、核酸増幅工程で増幅かつ標識された核酸をプローブとし、DNAマイクロアレイを用いて標的の核酸であるか否かを判定することを特徴とする請求項5に記載の核酸検出方法。
- [9] 上記試料は生体由来試料であることを特徴とする請求項1ないし8のいずれか1項に記載の核酸検出方法。
- [10] 上記生体由来試料はヒト由来であることを特徴とする請求項9に記載の核酸検出方法。
- [11] 請求項1ないし10のいずれか1項に記載の核酸検出方法を実施するためのキット

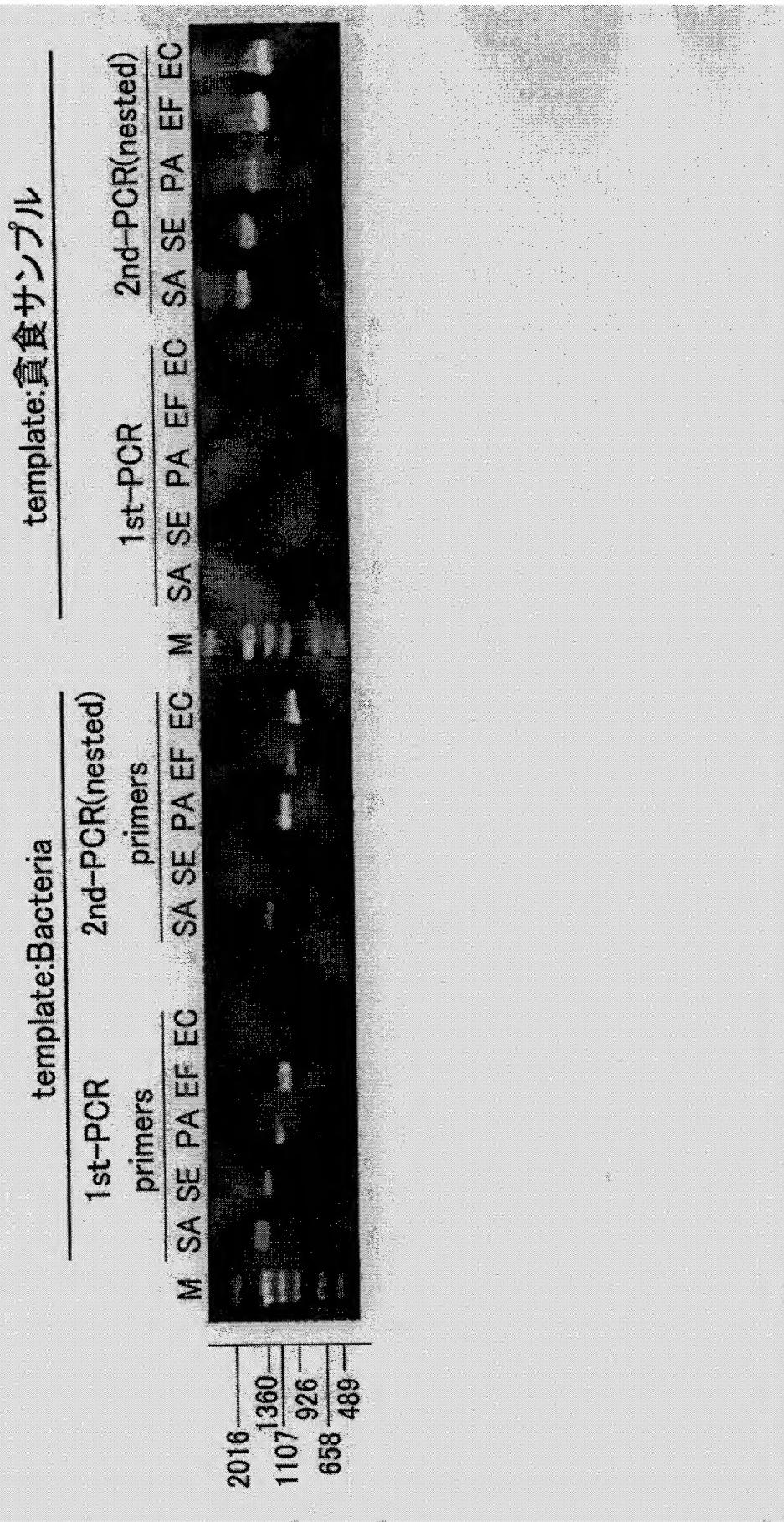
であつて、試料中の標的遺伝子を検出するために使用する遺伝子検出キット。

- [12] 請求項10に記載の核酸検出方法を実施するためのキットであつて、ヒトの疾患関連遺伝子を検出するために使用する遺伝子検出キット。
- [13] 上記ヒトの疾患関連遺伝子はヒトに感染した感染症原因微生物の遺伝子である請求項12に記載の遺伝子検出キット。
- [14] 上記ヒトに感染した感染症原因微生物の遺伝子は薬剤耐性遺伝子である請求項13に記載の遺伝子検出キット。
- [15] 上記ヒトに感染した感染症原因微生物の遺伝子は薬剤感受性遺伝子である請求項13に記載の遺伝子検出キット。
- [16] 上記ヒトの疾患関連遺伝子は癌マーカー遺伝子である請求項12に記載の遺伝子検出キット。
- [17] 上記ヒトの疾患関連遺伝子は遺伝性疾患関連遺伝子である請求項12に記載の遺伝子検出キット。
- [18] 少なくとも、標的遺伝子増幅プライマー、PCR反応用緩衝液、デオキシヌクレオシド三リン酸混合液、標識デオキシヌクレオシド三リン酸、耐熱性DNA合成酵素、試料固定化用支持体、増幅核酸検出用指示薬を含むことを特徴とする請求項11ないし17のいずれか1項に記載の遺伝子検出キット。

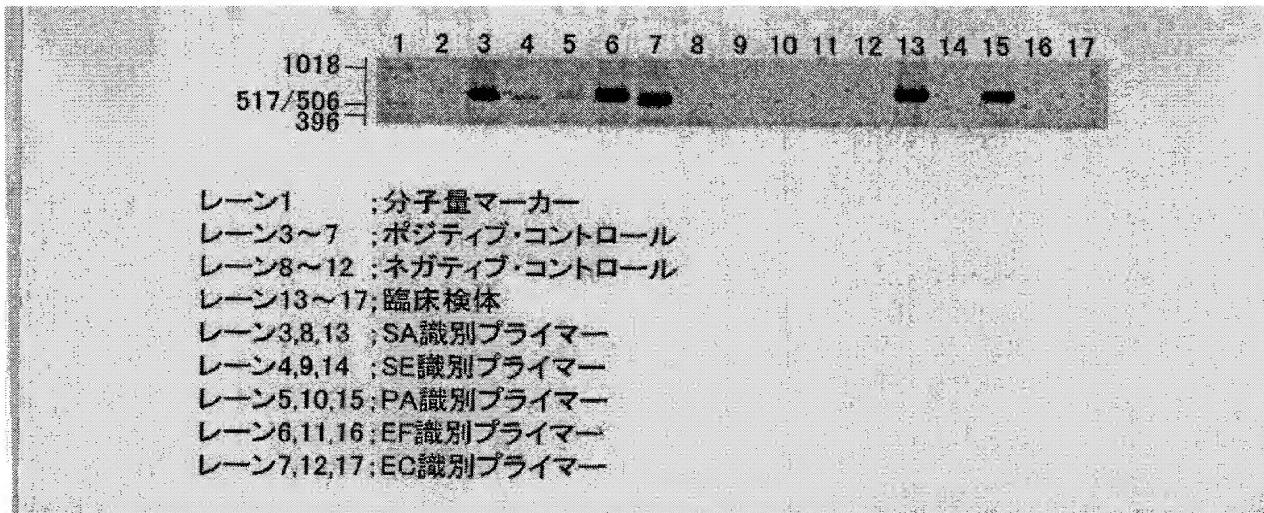
[図1]



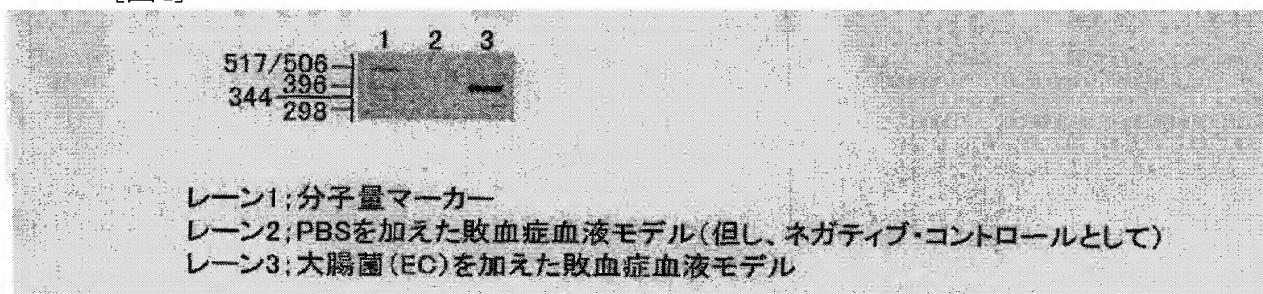
[図2]



[図3]



[図4]



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/001840

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

Int.Cl<sup>7</sup> C12Q1/68, C12N15/10, G01N33/50

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12Q1/68, C12N15/10, G01N33/50

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus (JICST)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 10-136999 A (Nitto Denko Corp.), 26 May, 1998 (26.05.98), Particularly, Claims 1 to 4 (Family: none)	1-18
X	JP 8-173192 A (Hamamatsu Photonics Kabushiki Kaisha), 09 July, 1996 (09.07.96), Particularly, Claims 1 to 4 (Family: none)	1-18
X	JP 10-500313 A (Becton Dickinson and Co.), 13 January, 1998 (13.01.98), Particularly, examples 1, 2 & EP 796347 A1 & US 5631147 A & US 5733752 A & US 5756702 A & WO 97/1196 A2	1-18

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
24 February, 2005 (24.02.05)

Date of mailing of the international search report  
15 March, 2005 (15.03.05)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/001840

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2000-504213 A (FRINDERS TECHNOLOGIES PTY LTD.), 11 April, 2000 (11.04.00), Particularly, page 13, line 5 to page 26, line 2 & EP 928327 A1 & WO 97/26324 A1	1-18
X	JP 2002-533695 A (American Registry of Pathology), 08 October, 2002 (08.10.02), Particularly, example 3 & EP 1154858 A1 & US 6703247 B1 & WO 00/38838 A1	1-18
X	WO 01/081541 A2 (RESEARCH DEVELOPMENT FOUNDATION), 01 November, 2001 (01.11.01), Particularly, examples 2, 3 & EP 1379537 A2 & JP 2004-504013 A & US 2001/0046667 A1 & US 6448014 B2	1-18
A	JP 2003-325181 A (Fuso Pharmaceutical Industries, Ltd.), 18 November, 2003 (18.11.03), Full text (Family: none)	1-18

## A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int. Cl' C12Q1/68, C12N15/10, G01N33/50

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int. Cl' C12Q1/68, C12N15/10, G01N33/50

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus(JICST)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP 10-136999 A(日東電工株式会社)1998.05.26 特に、請求項1-4参照(ファミリーなし)	1-18
X	JP 8-173192 A(浜松ホトニクス株式会社)1996.07.09 特に、請求項1-4参照(ファミリーなし)	1-18
X	JP 10-500313 A(ベクトン・ディッキンソン・アンド・カンパニー) 1998.01.13, 特に、実施例1, 2参照 & EP 796347 A1 & US 5631147 A & US 5733752 A & US 5756702 A & WO 97/11196 A2	1-18

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

## 国際調査を完了した日

24.02.2005

## 国際調査報告の発送日

15.3.2005

## 国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

## 特許庁審査官(権限のある職員)

上條 肇

4B 3131

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C(続き) .	関連すると認められる文献	関連する請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
X	JP 2000-504213 A(フлинダーズ・テクノロジーズ・プロプライエタリー・リミテッド)2000.04.11 特に、第13頁第5行-第26頁第2行参照 & EP 928327 A1 & WO 97/26324 A1	1-18
X	JP 2002-533695 A(アメリカン・レジストリー・オブ・パソロジー) 2002.10.08 特に、実施例3参照 & EP 1154858 A1 & US 6703247 B1 & WO 00/38838 A1	1-18
X	WO 01/081541 A2 (RESEARCH DEVELOPMENT FOUNDATION)2001.11.01 特に、実施例2, 3参照 & EP 1379537 A2 & JP 2004-504013 A & US 2001/0046667 A1 & US 6448014 B2	1-18
A	JP 2003-325181 A(扶桑薬品工業株式会社)2003.11.18 全文(ファミリーなし)	1-18